

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/07464

25.10.00

REC'D 08 DEC 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2000年 1月26日

出願番号  
Application Number:

特願2000-021797

出願人  
Applicant(s):

昭和電工株式会社

JP00/7464

3 ENU

PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年12月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3099288

【書類名】 特許願  
【整理番号】 11H110389  
【あて先】 特許庁長官殿  
【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内

【氏名】 蒲池 晴美

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内

【氏名】 青木 裕史

【特許出願人】

【識別番号】 000002004

【氏名又は名称】 昭和電工株式会社

【代表者】 大橋 光夫

【代理人】

【識別番号】 100094237

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢口 平

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第248161号

【出願日】 平成11年 9月 2日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010227

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 9702281

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。

【請求項 2】 配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする DNA 配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。

【請求項 3】 ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (Rhodococcus sp.) ATCC 39484 株である請求項 1 または 2 に記載のニトリラーゼ遺伝子。

【請求項 4】 請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載の遺伝子 DNA を含むプラスミド。

【請求項 5】 請求項 4 に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からニトリラーゼを採取することを特徴とするニトリラーゼの製造法。

【請求項 7】 請求項 5 に記載の形質転換体を用いてニトリル化合物のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

【請求項 8】 請求項 5 に記載の形質転換体を用いてポリニトリル化合物の特定のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするシアノカルボン酸類の製造法。

【請求項 9】 ポリニトリル化合物が芳香族ポリニトリル化合物である請求項 8 に記載のシアノカルボン酸類の製造法。

【請求項 10】 芳香族ポリニトリル化合物がフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、シアノカルボン酸類が対応する *o*-、*m*-または *p*-シアノ安息香酸である請求項 9 に記載のシアノカルボン酸類の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

## 【産業上の利用分野】

本発明は芳香族ポリニトリル化合物のニトリル基に対し、特に優れた位置選択性を示すロドコッカス属細菌由来のニトリル分解酵素であるニトリラーゼおよびこれを用いるカルボン酸類、特にシアノカルボン酸類の製造法に関する。シアノカルボン酸類は、医薬合成のための中間体として有用である。

## 【0002】

## 【従来の技術】

ニトリラーゼはニトリル化合物をカルボン酸に変換する反応を触媒する酵素であり、ニトリル化合物から医薬原料等に有用なカルボン酸を得る手段として有用である。当該酵素を産生する微生物としては、例えば *Fusarium solani* (Biochem. J. 167, 685-692 (1977))、*Nocardia* sp. (Int. J. Biochem. 17, 677-683 (1985))、*Arthrobacter* sp. (Appl. Environ. Microbiol. 51, 302-306 (1986))、*Rhodococcus rhodochrous* J1 (Eur. J. Biochem. 182, 349-356 (1989))、*Rhodococcus rhodochrous* K-22 (J. Bacteriol. 172, 4807-4815 (1990))、*Rhodococcus rhodochrous* PA-34 (Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 184-190 (1992))、*Rhodococcus* sp. ATCC39484 (Biotechnol. Appl. Biochem. 15, 283-302 (1992)) 等を挙げることができる。

## 【0003】

また、これらの微生物からはニトリラーゼあるいはニトリルヒドラーターゼやアミダーゼが精製され、さらにはこれらの酵素の遺伝子工学的利用を計るため、その遺伝子が単離され一次構造が決定されているものもある。ニトリラーゼ遺伝子については、例えばロドコッカス属細菌由来の遺伝子が特開平7-99980号公報あるいは特開平9-28382号公報において開示されている。

## 【0004】

近年、このような微生物がもつニトリル化合物の変換能を応用する試みがなされている。特に付加価値の高い化合物の製造に利用するために、立体選択性や位置選択性に優れた酵素が望まれている。例えば、特開平2-84198号公報には光学活性な $\alpha$ -置換有機酸の製造に用いる微生物について、特開平4-341185号公報には光学活性な2-ヒドロキシカルボン酸の製造に用いる微生物について、EP0433117号には光学活性なケトプロフェンの製造に用いる微生物についてそれぞれ開示されている。

## 【0005】

このような微生物のうち、ロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484 株は複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつことが報告されている (US 556625)。この選択的なニトリル分解酵素系によって生成されるニトリル基とカルボキシル基を分子内に持つ化合物は医薬製造の合成ブロックとして極めて有効である。しかしながら、本菌のもつニトリラーゼの芳香族ポリニトリル化合物に対する活性は比較的低く、この特性を工業的に利用するためには、反応を触媒する酵素の生産性向上が必須であった。しかし、これらの改変に必要な本菌のニトリラーゼ遺伝子は明らかにされていなかった。

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的はロドコッカス属細菌由来の新規なニトリラーゼ遺伝子を提供することにある。また、本発明の目的は、遺伝子工学的手法を用いてこのニトリラーゼを効率良く生産する方法を提供することにある。更に、本発明の他の目的はこのニトリラーゼを用いるニトリル化合物からカルボン酸類の製造法、特にポリニトリル化合物の特定のニトリル基を選択的にカルボキシル基に変換するシアノカルボン酸類の製造法を提供することにある。

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、下記(1)～(10)の構成を有する。

(1) 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。

(2) 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。

(3) ロドコッカス属細菌がロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484株である(1)または(2)に記載のニトリラーゼ遺伝子。

(4) (1)～(3)に記載の遺伝子DNAを含むプラスミド。

(5) (4)に記載のプラスミドで形質転換された形質転換体。

#### 【0008】

(6) (5)に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物からニトリラーゼを採取することを特徴とするニトリラーゼの製造法。

(7) (5)に記載の形質転換体を用いてニトリル化合物のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするカルボン酸類の製造法。

(8) (5)に記載の形質転換体を用いてポリニトリル化合物の特定のニトリル基をカルボキシル基に変換することを特徴とするシアノカルボン酸類の製造法。

(9) ポリニトリル化合物が芳香族ポリニトリル化合物である(8)に記載のシアノカルボン酸類の製造法。

(10) 芳香族ポリニトリル化合物がフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、シアノカルボン酸類が対応する $o$ -、 $m$ -または $p$ -シアノ安息香酸である(9)に記載のシアノカルボン酸類の製造法。

#### 【0009】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。ロドコッカス エスピーのニトリラーゼ遺伝子のDNA配列の決定方法について説明する。例えば、ロドコッカス エスピー (*Rhodococcus* sp.) ATCC 39484株染色体DNAは、例えばSaitoらの方法(Biochem. Biophys. Acta.

72, 619 (1963)) を応用して調製することができる。遺伝子のクローニングに用いる染色体DNAライブラリーは、例えばpUC18などのプラスミドベクターを用いて作製することができる。ニトリラーゼ遺伝子のクローニングは、例えばSaikiらのPolymerase Chain Reaction (PCR) 法 (Science 230, 1350 (1985)) を用いて行うことができる。この時、使用するPCR用プライマーの一方は、ユニバーサルプライマー (フォワードまたはリバース) とし、他方は酵素N末端配列をコードするDNA配列から、適当な配列を選抜する。これらのプライマーを組み合わせ、染色体DNAライブラリーを鋳型としてアンカーPCRを行うことによって、目的酵素のコード配列断片を得ることができる。このアンカーPCR法で得たニトリラーゼコード配列DNA部分断片を全遺伝子領域スクリーニング用プローブとして使用することにより、ロドコッカス エスピー (Rhodococcus sp.) ATCC 39484 株の染色体DNAライブラリーからニトリラーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを得ることができる。ニトリラーゼコード配列断片のDNA配列は、Sangerらによるdideoxy法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463 (1977)) など公知の手法を用いて決定することができる。

#### 【0010】

得られた酵素構造遺伝子を用いてニトリラーゼ酵素を生産するためには、酵素構造遺伝子を適当な発現ベクター、例えばpUC18のlacプロモーターの下流に接続するなどして作成することができる。このようにして作成したプラスミドを用いて、例えば大腸菌JM101株 (Escherichia coli JM101) などの宿主を形質転換する。この形質転換体を培養することにより、該ニトリラーゼが宿主細胞内に著量生産される。このニトリラーゼ酵素は菌体のまま変換反応に使用することもできるが、菌体を破碎して無細胞抽出液として、あるいは精製酵素として使用することもできる。

#### 【0011】

本発明の原料として用いるニトリル化合物は、ニトリル基を1個含む脂肪族または芳香族の化合物、あるいは複数のニトリル基を含む脂肪族または芳香族のポ



リニトリル化合物である。フタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルを原料として用いると対応する高純度の $o$ -、 $m$ -または $p$ -シアノ安息香酸を好ましく取得できる。

#### 【0012】

本発明の変換反応は、例えばリン酸緩衝液のごとき希薄水溶液に、原料となる物質と変換活性を有する菌体、無細胞抽出液、あるいは酵素を加え、 $pH$  5~10、望ましくは6~8、温度15~45℃、望ましくは30~42℃で行うことができる。

#### 【0013】

反応液中に生成した生産物の取得方法は特に限定されないが、例えば、反応液の上清を分離回収した後、生産物の特性に応じて沈殿形成、抽出または蒸留等の方法を用いて、あるいはそれらの方法を組み合わせて取得できる。またカラムクロマトグラフィー等を用いて分離精製することにより高純度の生成物を得ることができる。

#### 【0014】

##### 【実施例】

以下実施例にて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0015】

##### 実施例1；染色体DNAの調製

Lブロス（ポリペプトン1%、 $NaCl$  0.5%、酵母エキス0.5%、 $pH$  7.0）に2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地で一昼夜培養したR. s p. ATCC 39484株一白金耳を基本培地（ $KH_2PO_4$  1.5 g/l、 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  0.75 g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g/l、 $CaSO_4 \cdot 2H_2O$  10 mg/l、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  5 mg/l、酵母エキス 20 mg/l）にグルコース5 g/l、尿素2 g/lを加えた培地300 mlで30℃、24時間培養した。培養後の菌体を集菌し、5 mMのEDTA溶液100 mlで菌体を洗浄した。この菌体を30 mlの緩衝液（20 mMトリス塩酸緩衝液（ $pH$  7.1））に懸濁し、60 mgのリゾチームを加

え37℃で2時間インキュベートした。この懸濁液を遠心(5000rpm, 7分間)して菌体を回収し、11.34mlのTE Bufferに再懸濁し、10%SDS0.6mlを加え、さらに100μg/mlの濃度となるようにプロテナーゼK(メルク社製)を加え、1時間、55℃でゆるやかに振盪した。この溶液をフェノール抽出、エタノール沈殿することによって染色体DNAを調製した。

#### 【0016】

##### 実施例2；染色体ライブラリーの作製

得られた染色体DNA20μgに対し制限酵素Sau3AIを用いて部分消化を行った。即ち、染色体DNAを4μgづつ5本のチューブにとり、100μlの反応容量中で、制限酵素Sau3AI(宝酒造社製、4~12U/μl)を添加し37℃で反応させ、10秒毎にチューブの一本を取り、終濃度20mMとなるようEDTAを加え反応を停止させた。このようにして調製した染色体DNAの部分消化断片溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、1~2kbのDNA断片を泳動抽出およびエタノール沈殿にて回収し、30μlのTE溶液に溶解させた。この試料の9μlと1μgのBamHI消化後BAP処理したpUC18(宝酒造社製)とをT4DNAリガーゼ(宝酒造社製、ライゲーションキットver.2)を用いてライゲーションした後、大腸菌JM101株を形質転換した。このライブラリーの増幅ライブラリーを作製するために、大腸菌形質転換体を20コロニーずつアンピシリン50ppmを含むLプロスに植菌し、一昼夜培養した菌体からアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出した。

#### 【0017】

##### 実施例3；アンカーPCR法

クローニングに先立ち、プローブとする酵素遺伝子部分断片を得るため、アンカーPCRを行った。酵素配列に由来する一方のプライマーは、公知の本酵素N末端配列から、適当なT<sub>m</sub>を持つように配列を選択して作成した。すなわち、

5'-gct gcg gtg cag gca-3' (およびその相補鎖)、

T<sub>m</sub>=52℃

PCR法は以下の反応条件でおこなった。

## 【0018】

## 反応液組成：

R. s p. ATCC 39484 染色体DNAライブラリー	1 $\mu$ g
ユニバーサルプライマー	100 pmol
酵素N末端プライマー	100 pmol
dNTP溶液	各1 mM
10x反応バッファー	10 $\mu$ l
ExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製)	2.5 U
	計50 $\mu$ l

## 反応条件：

熱変性	94℃、45秒
アニーリング	37～55℃、60秒
伸長	72℃、60～90秒
サイクル数	24回

このようにして行った反応のうち、特異的に増幅される断片が見られた反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、断片を含む部分のゲルを切り出し、E S A Y T R A P ver. 2 (宝酒造社製)を用いて精製した。これらのDNA断片について、d i d e o x y法によりDNA配列を決定し、翻訳されたアミノ酸配列がR. s p. ATCC 39484株のニトリラーゼN末端配列と一致するものを探索した。その結果、得られた断片中に、ニトリラーゼ287アミノ酸をコードするDNA配列を含む約900bpの断片が見つかった。

## 【0019】

## 実施例4；コロニーハイブリダイゼーション

実施例3で得られたニトリラーゼ遺伝子の一部を含むPCR断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法により全遺伝子のクローニングを行った。実施例2の方法に従ってS a u 3 A Iで分解した染色体DNAの部分消化断片溶液を1%のアガロースゲル電気泳動に供し、4～8kbのDNA断片を泳動抽出およびエタノール沈殿にて回収し、乾燥後30  $\mu$  lのTE溶液に溶解した。この試料溶液の9  $\mu$  lと、1  $\mu$  lのB a m H I消化後B A P処理したp U C 1 8

(宝酒造社製、100 ng) とをT4 DNAリガーゼ(宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2) を用いてライゲーションした後、大腸菌JM101株を形質転換し、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド(IPTG) 0.1 mM、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(X-gal) 0.004%、アンピシリン50 ppmを含むLブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に塗布して37℃で一昼夜培養した。

#### 【0020】

生じた白色コロニーを、アンピシリン50 ppmを含むLブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に釣菌し、37℃で一昼夜培養した。十分生育した後、寒天平板培地を約2時間4℃に置き冷却した。乾いたナイロンメンブレン(アマシャム ファルマシア バイオテック社製、Hybond-N<sup>+</sup>) に上下左右の印を鉛筆で付けた後冷却した平板培地の上に静かに置き、メンブレンが全体に濡れてくるのを待って静かにかつ一気にはがし、平板上のコロニーをメンブレンに移し取った。移し取った菌体が少ない時は、メンブレンをアンピシリン50 ppmを含むLブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に置き、37℃で一昼夜培養した。

#### 【0021】

菌体を移したメンブレンを3 mlのアルカリ溶液(NaOH 0.5 M) 上に浮かせ、菌体を溶解した。溶解した菌体の残査を、5×SSCで20分間×2回洗浄して落とした。このメンブレンに対し、Random prime DNA labelling and detection system(アマシャム ファルマシア バイオテック社製) を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション?検出の手順は、同キット添付のマニュアルに従って標準的な条件で行った。約4000コロニーに対して行ったハイブリダイゼーションの結果、2株のポジティブクローンが得られた。

#### 【0022】

これらのポジティブクローンからアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出し、プローブ用部分断片中にある制限酵素切断サイトの位置と、プラスミドの制限酵素分解パターンとを比較して、挿入断片中の遺伝子の位置と方向を推定した。

。その結果、2つのクローン株から調整したプラスミド pNL06 および pNL09 は、ともに全ニトリラーゼ遺伝子を含んでいることが分かった (図1)。そこでより挿入断片長の長い P09 株のプラスミド (pNL09) を用いて、*di deoxy* 法により挿入断片約 2.6 kb の DNA 配列を決定した。プローブとして用いた部分断片配列と一致する部分を探索したところ、挿入断片端から約 300 bp 下流から *lac* プロモーターに対して正方向にニトリラーゼ遺伝子が存在していることが分かった。この方向と位置は、制限酵素の切断サイトから推定した遺伝子の位置と方向に一致していた。このニトリラーゼ遺伝子配列から翻訳されたアミノ酸配列は、既知のいずれのニトリラーゼのアミノ酸配列とも異なる新規なものであった。

## 【0023】

## 実施例 5 ; ニトリラーゼ活性の測定

ニトリラーゼ活性は 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 10 ml にテレフタルニトリル (TPN) を基質として 1~10 質量% を懸濁した反応液に、菌体 (湿体質量で 1 g 前後) を加えて 30℃ で振とうしながら反応を行い、一定時間毎に反応液中に生成したパラシアノ安息香酸を HPLC で定量することによって測定した。通常、反応液から固形物を遠心分離して除去した後、上清を溶離液で 100 倍希釈したものを HPLC サンプルとして用いた。パラシアノ安息香酸の定量は、以下の装置・条件で行った。

## 【0024】

装置 ; ポンプ ; DS-2 (Shodex)

検出器 ; SPD-6AV UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu)

サンプル導入 ; Autosampler Model 23 (SIC) with 20 ul sample tube

記録 ; Chromatocoder 12 (SIC)

カラム ; ODSpak F-411 (Shodex), 4.6×150mm, 40℃

分離条件 ; AcCN/H<sub>2</sub>O=50:50, 0.1%TFA, 1ml/min.

活性は乾燥質量 1 g の菌体が 1 時間に 1 l の反応液中に生成するパラシアノ安息香酸の質量 (g/l/hr/g 乾燥菌体) で表すことにした。

## 【0025】

## 実施例6；高発現株の作成

実施例4で得たポジティブクローンP09株をアンピシリン50ppmを含むLブロスで培養すると、イソプロピルーB-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）の存在の如何に関わらず弱いニトリラーゼ活性が確認できた。しかしこの活性はドナーであるロドコッカス属細菌の数十分の一という低いものであった。他方のP06株にはニトリラーゼ活性はまったく認められなかった。

## 【0026】

そこで酵素生産量を増やすため、酵素構造遺伝子部分のみ、および酵素構造遺伝子とその下流領域約1.3kbを含む2種の断片をPCRで作成し、pUC18のlacプロモーター直後につないだプラスミドpUNLE1およびpUNLE2を作成した。PCR断片作成に用いたプライマーおよび反応条件は以下の通り。

## 【0027】

pUNLE1

(フォワード)

5'-aac atg gtc gaa tac aca aac-3'

(リバーズ)

5'-cc aag ctt tca gag ggt ggc tgt-3'

HindIIIサイト

pUNLE2

フォワード

pUNLE1と同じ

リバーズ

M13 primer M4

## 【0028】

反応液組成：

プラスミドDNA

0.8~1μg

プライマー

各100pmol

dNTP溶液

各1mM

10x反応バッファー

10μl

ExTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）

2.5U

計50 $\mu$ l

反応条件：

熱変性	94℃、60秒
アニーリング	55℃、60秒
伸長	72℃、120秒
サイクル数	24回

生成した断片をアガロースゲル電気泳動し、抽出・回収した。断片を制限酵素NcoIとHindIIIで切断し、EcoRI/NcoIリンカーとライゲーション後、EcoRI/HindIIIカットしたpUC18とライゲーションした(図2)。

これらのプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換し、得られた形質転換体をアンピシリン50ppmを含むLBプロスで一昼夜培養した後、イソプロピルーB-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を0.1mMになるよう培養液に加えてさらに2時間培養した。得られた形質転換体のニトリル変換活性を実施例5に示した方法により測定したところ、いずれのプラスミドで形質転換した形質転換体も、pUNL09形質転換体の約500倍、およびドナーであるロドコッカス属細菌の約80倍のニトリラーゼ活性が確認できた(表1)。

【0029】

【表1】

株	非誘導時の活性	誘導時の活性
R. sp. ATCC39484	-	0.14
pUNL09形質転換体	0.029	0.022
pUNLE1形質転換体	0.51	11.1
pUNLE2形質転換体	0.46	10.6

活性単位：g/l/hr/g乾燥菌体

【0030】

実施例7；高活性株を用いたパラシアノ安息香酸の製造

実施例6で得たpUNLE1形質転換体をアンピシリン50ppmを含むLB

ロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地で一昼夜培養した菌体一白金耳を、アンピシリン100ppmを含むLブロス100mlに植菌し、37℃で振とう培養した。この培養液をさらにアンピシリン100ppmを含むLブロス2lを張り込んだ5Lジャーファーマンターに植菌し、37℃、800rpm、通気1ml/min.で一昼夜通気攪拌培養した。定常期初期か対数増殖期終期の菌体培養液に、終濃度0.1mMになるようイソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、さらに4時間培養を続行した。

#### 【0031】

培養液を遠心分離して得た菌体を、20mMリン酸緩衝液(pH7.0)1lに再懸濁し、100gのテレフタルニトリル(TPN)を加え、35℃で攪拌しながら反応を行った。反応液の一部を1時間毎に取り、実施例5の方法により反応液中に生じたパラシアノ安息香酸を定量した。パラシアノ安息香酸は形質転換体により速やかに生成され、約3時間で反応液中に3%蓄積した(図3)。反応終了後、反応液に濃塩酸を添加してpHを1とし、パラシアノ安息香酸を沈殿させた。これを濾紙で濾過し、希塩酸(0.1mol/l)で洗浄した後、真空乾燥した。この乾燥標品の純度は99.9%以上であった。不純物として検出されたのは原料テレフタル酸であった。

#### 【0032】

##### 【発明の効果】

本発明は複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつロドコッカス属細菌のニトリラーゼ遺伝子のDNA配列およびこのニトリラーゼを用いた効率的なカルボン酸類の製造法を提供するものである。得られた形質転換体の変換活性は遺伝子ドナーに比して十分に高く、生成物の純度も高いことから有用化合物の工業的生産へ適用できる。

#### 【0033】

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】 コロニーハイブリダイゼーション(実施例4)で得られたポジティブクローンから調整したプラスミドの構造。

【図2】 ニトリラーゼ遺伝子発現プラスミドの構築。



【図 3】 テレフタロニトリル→パラシアノ安息香酸変換反応におけるパラシアノ安息香酸の蓄積カーブの比較。

【 0 0 3 4 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K.K.

<120> Nucleic acid encoding nitrilase from *Rhodococcus* sp.  
ATCC 39484 useful for conversion of aromatic  
poly-nitrile compounds to acids.

<130> 11H110389

<150> JP 11-248161

<151> 1999-9-2

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1531

<212> DNA

<213> *Rhodococcus* sp.

<220>

<221> CDS

<222> (324)..(1421)

&lt;400&gt; 1

agcttgacca tgattacgaa ttcgagctcg gtacccgggg atcgaaccag caacggggac 60

gcacagtcga cgtagacctc gacctatccg ccgttcgcga gaaggacacc gaccaccacc 120

acttcaacat ctttcaacgt gcccggccag tccttcgacg aatcgaaacg gcgaagagcc 180

gcctcggacc ccccggccga accgctcgat gaactcccct acacgggtgg cgcagaatgc 240

caggaccggt gtcatccac gtcaattcac gcgccttttc acctcgtact gtcctgccaa 300

acacaagcaa cggaggtacg gac atg gtc gaa tac aca aac aca ttc aaa gtt 353

Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val

1

5

10

gct gcg gtg cag gca cag cct gtg tgg ttc gac gcg gcc aaa acg gtc 401

Ala Ala Val Gln Ala Gln Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val

15

20

25

gac aag acc gtg tcc atc atc gcg gaa gca gcc cgg aac ggg tgc gag 449

Asp Lys Thr Val Ser Ile Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu

30

35

40

ctc gtt gcg ttt ccc gag gta ttc atc ccg ggg tac ccg tac cac atc 497

Leu Val Ala Phe Pro Glu Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile

45

50

55

tgg gtc gac agc ccg ctc gcc gga atg gcg aag ttc gcc gtg cgc tac 545

Trp Val Asp Ser Pro Leu Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr

60

65

70

cac gag aat tcc ctg acg atg gac agc ccg cac gta cag cgg ttg ctc 593

His Glu Asn Ser Leu Thr Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu

75

80

85

90

gat gcc gcc cgc gac cac aac atc gcc gta gtg gtg gga atc agc gag 641

Asp Ala Ala Arg Asp His Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu

95

100

105

cgg gat ggc ggc agc ttg tac atg acc cag ctc atc atc gac gcc gat 689

Arg Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp Ala Asp

110

115

120

ggg caa ctg gtc gcc cga cgc cgc aag ctc aag ccc acc cac gtc gag 737

Gly Gln Leu Val Ala Arg Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu

125

130

135

cgt tcg gta tac gga gaa gga aac ggc tcg gat atc tcc gtg tac gac 785

Arg Ser Val Tyr Gly Glu Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp

140

145

150

atg cct ttc gca cgg ctt ggc gcg ctc aac tgc tgg gag cat ttc cag 833

Met Pro Phe Ala Arg Leu Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln

155

160

165

170

acg ctc acc aag tac gca atg tac tcg atg cac gag cag gtg cac gtc 881

Thr Leu Thr Lys Tyr Ala Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val

175

180

185

gcg agc tgg cct ggc atg tcg ctg tac cag ccg gag gtc ccc gca ttc 929

Ala Ser Trp Pro Gly Met Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe

190

195

200

ggt gtc gat gcc cag ctc acg gcc acg cgt atg tac gca ctc gag gga 977

Gly Val Asp Ala Gln Leu Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly

205

210

215

caa acc ttc gtg gtc tgc acc acc cag gtg gtc aca ccg gag gcc cac 1025

Gln Thr Phe Val Val Cys Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His

220

225

230

gag ttc ttc tgc gag aac gag gaa cag cga atg ttg atc ggc cga ggc 1073

Glu Phe Phe Cys Glu Asn Glu Glu Gln Arg Met Leu Ile Gly Arg Gly

235

240

245

250

gga ggt ttc gcg cgc atc atc ggg ccc gac ggc cgc gat ctc gca act 1121

Gly Gly Phe Ala Arg Ile Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr

255

260

265

cct ctc gcc gaa gat gag gag ggg atc ctc tac gcc gac atc gat ctg 1169

Pro Leu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu

270

275

280

tct gcg atc acc ttg gcg aag cag gcc gct gac ccc gtg ggc cac tac 1217

Ser Ala Ile Thr Leu Ala Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr

285

290

295

tca cgg ccg gat gtg ctg tgc ctg aac ttc aac cag cgc cgc acc acg 1265

Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg Arg Thr Thr

300

305

310

ccc gtc aac acc cca ctt tcc acc atc cat gcc acg cac acg ttc gtg 1313

Pro Val Asn Thr Pro Leu Ser Thr Ile His Ala Thr His Thr Phe Val

315

320

325

330

ccg cag ttc ggg gca ctc gac ggc gtc cgt gag ctc aac gga gcg gac 1361

Pro Gln Phe Gly Ala Leu Asp Gly Val Arg Glu Leu Asn Gly Ala Asp

335

340

345

gaa cag cgc gca ttg ccc tcc aca cat tcc gac gag acg gac cgg gcg 1409

Glu Gln Arg Ala Leu Pro Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp Arg Ala

350

355

360

aca gcc acc ctc tgactcgggc gcacccgtgg cgcctccgaa gcgccacggg 1461

Thr Ala Thr Leu

365

tgtgtgaagg ggcgagacag gggaatcgga ggatccccgg gtaccgagct cgaattcgta 1521

atcatggtca

1531

<210> 2

<211> 366

<212> PRT

&lt;213&gt; Rhodococcus sp.

&lt;400&gt; 2

Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Gln

1 5 10 15

Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Thr Val Ser Ile

20 25 30

Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu Leu Val Ala Phe Pro Glu

35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile Trp Val Asp Ser Pro Leu

50 55 60

Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr

65 70 75 80

Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu Asp Ala Ala Arg Asp His

85 90 95

Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu

100 105 110

Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg

115 120 125

Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Ser Val Tyr Gly Glu

130 135 140

Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu  
145 150 155 160

Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala  
165 170 175

Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly Met  
180 185 190

Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala Gln Leu  
195 200 205

Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe Val Val Cys  
210 215 220

Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe Phe Cys Glu Asn  
225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Met Leu Ile Gly Arg Gly Gly Gly Phe Ala Arg Ile  
245 250 255

Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Glu Asp Glu  
260 265 270

Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala  
275 280 285

Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu



290

295

300

Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg Arg Thr Thr Pro Val Asn Thr Pro Leu

305

310

315

320

Ser Thr Ile His Ala Thr His Thr Phe Val Pro Gln Phe Gly Ala Leu

325

330

335

Asp Gly Val Arg Glu Leu Asn Gly Ala Asp Glu Gln Arg Ala Leu Pro

340

345

350

Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp Arg Ala Thr Ala Thr Leu

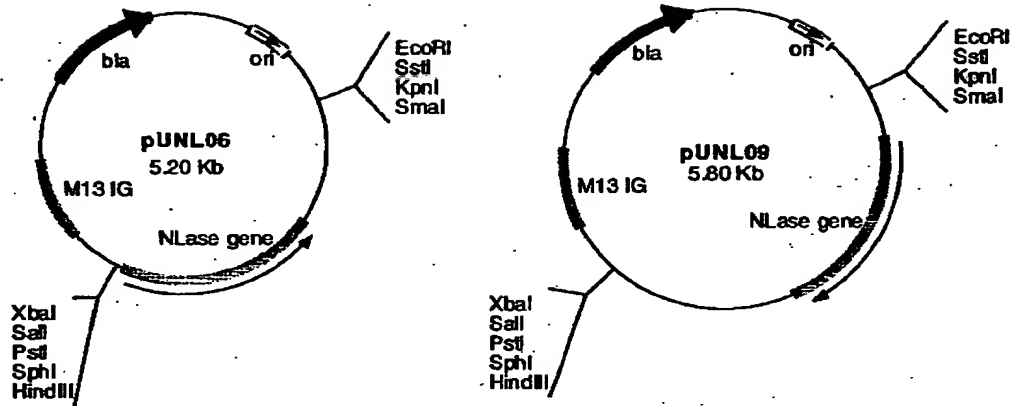
355

360

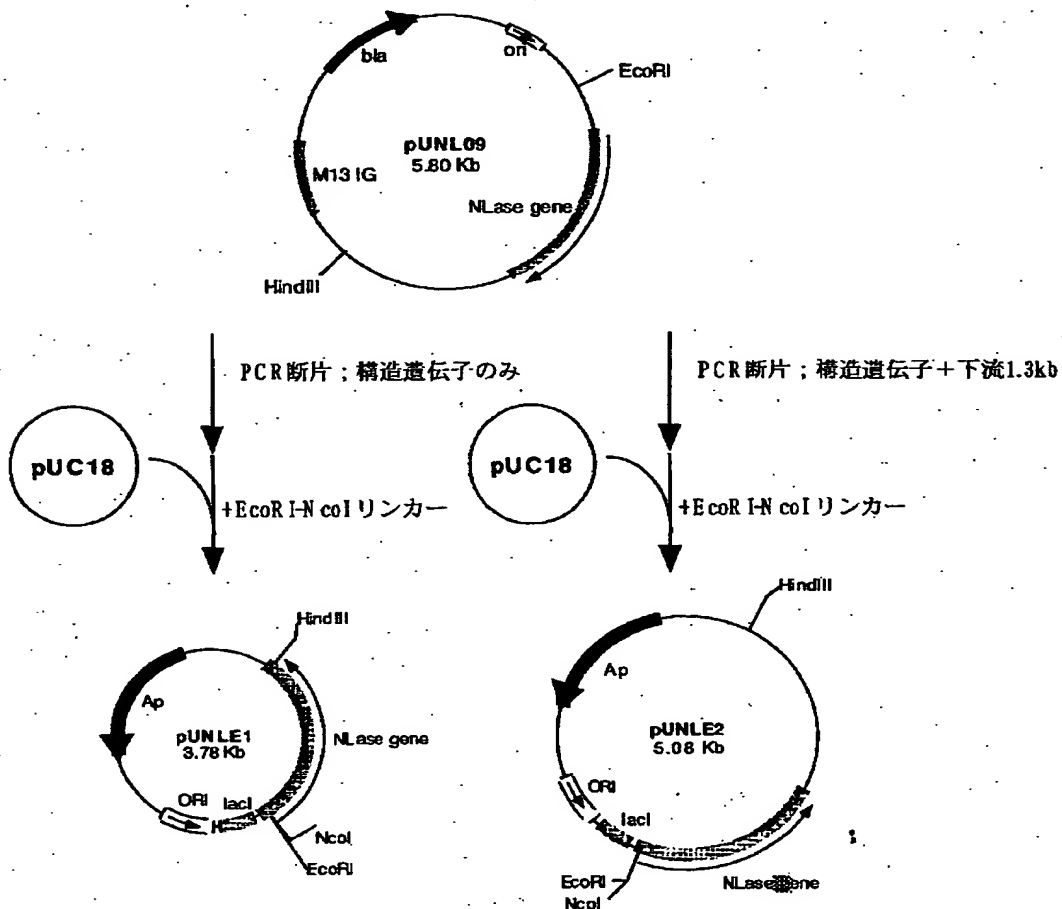
365

【書類名】 図面

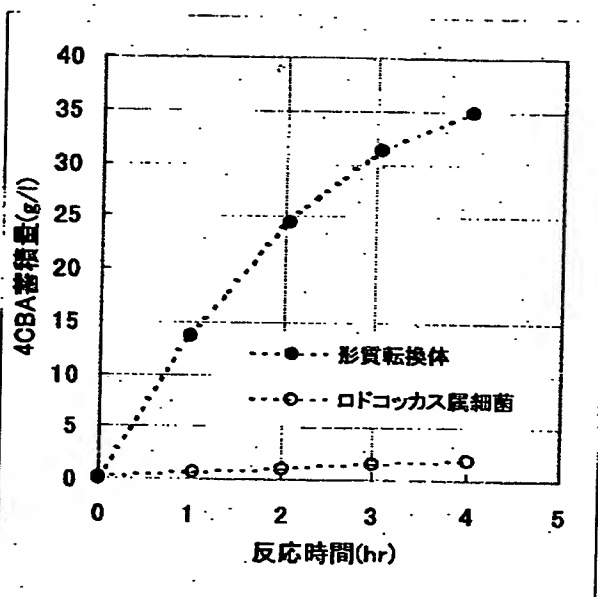
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ロドコッカス属細菌由来の新規なニトリラーゼ遺伝子を提供すること。また、遺伝子工学的手法を用いてこのニトリラーゼを効率良く生産する方法を提供すること。更に、このニトリラーゼを用いるニトリル化合物からカルボン酸類の製造法、特にポリニトリル化合物の特定のニトリル基を選択的にカルボキシル基に変換するシアノカルボン酸類の製造法を提供すること。

【解決手段】 複数のニトリル基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつロドコッカス属細菌のニトリラーゼ遺伝子のDNA配列およびこのニトリラーゼ用いた効率的なカルボン酸類の製造法を提供する。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-021797
受付番号	50005008249
書類名	特許願
担当官	第八担当上席
作成日	平成12年 1月31日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 1月26日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002004]

1. 変更年月日 1990年 8月27日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都港区芝大門1丁目13番9号  
氏 名 昭和電工株式会社